



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A23D 9/007</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/16119</p> <p>(43) 国際公開日 1998年4月23日(23.04.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03631</p> <p>(22) 国際出願日 1997年10月9日(09.10.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/289172 1996年10月11日(11.10.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) サントリー株式会社(SUNTORY LIMITED)[JP/JP] 〒530 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka, (JP) 日本水産株式会社(NIPPON SUISAN KAISHA, LTD.)(JP/JP) 〒100 東京都千代田区大手町二丁目6番2号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 東山堅一(HIGASHIYAMA, Kenichi)[JP/JP] 〒618 大阪府三島郡島本町山崎1-9-5-602 Osaka, (JP) 秋元健吾(AKIMOTO, Kengo)[JP/JP] 〒618 大阪府三島郡島本町山崎1-9-5-1006 Osaka, (JP) 清水 昌(SHIMIZU, Sakayu)[JP/JP] 〒616 京都府京都市右京区常盤山下町6-9 Kyoto, (JP)</p>		<p>土居崎信滋(DOISAKI, Nobushige)[JP/JP] 降旗清代美(FURIHATA, Kiyomi)[JP/JP] 〒192 東京都八王子市北野町559-6 日本水産株式会社 中央研究所内 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 須藤阿佐子(SUDOU, Asako) 〒184 東京都小金井市梶野町5-6-3-103 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: EDIBLE FATS CONTAINING ARACHIDONIC ACID AND FOODS CONTAINING THE SAME</p> <p>(54)発明の名称 アラキドン酸含有食用油脂およびそれを含有する食品</p> <p>(57) Abstract Edible fats containing arachidonic acid obtained from microorganisms belonging to the subgenus <i>Mortierella</i> of the genus <i>Mortierella</i> and being capable of producing arachidonic acid, containing little unsaponified matters and, above all, the smallest possible amount of cyclopropane sterols which have never been eaten, and being suitable for the production of foods, in particular, modified milks for infants. The fats contain not more than 0.8 % by weight, preferably not more than 0.6 % by weight of unsaponified matters and 20 % by weight or more of arachidonic acid originating in microorganisms. Further, these fats contain not more than 0.3 % by weight, preferably not more than 0.15 % by weight of 24,25-methylencholest-5-en-3<math>\beta</math>-ol. The microorganisms are those belonging to the subgenus <i>Mortierella</i> of the genus <i>Mortierella</i> and being capable of producing arachidonic acid. These microorganisms belong to the species <i>alpina</i> of the genus <i>Mortierella</i>. The foods include modified milks for premature infants, modified milks for infants, foods for infants, and foods for pregnant women and nursing mothers containing the above-mentioned edible fats.</p>		

(57) 要約

アラキドン酸生産能を有するモルティエレラ属のモルティエレラ亜属に属する微生物から得られるアラキドン酸含有油脂であって、不ケン化物含量が少なく、その中でも特に食経験のないシクロプロパン環を有するステロールを極力、含有せず、食品、特に乳幼児用調製乳の製造に適したアラキドン酸含有食用油脂の提供。

不ケン化物含量が0.8重量%以下、好ましくは0.6重量%以下で、かつ、アラキドン酸含量が20重量%以上である微生物由来のアラキドン酸含有食用油脂。さらに上記食用油脂は、24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 $\beta$ -オールが0.3重量%以下、好ましくは0.15重量%以下である。微生物がアラキドン酸生産能を有するモルティエレラ属のモルティエレラ亜属に属する微生物である。上記モルティエレラ亜属に属する微生物はモルティエレラ属アルピナ種に属する微生物である。アラキドン酸含有食用油脂を配合してなる食品。アラキドン酸含有食用油脂を配合してなる、未熟児用調製乳、幼児用調製乳、幼児用食品、又は妊産婦用食品。

PCTに基づいて公開される国際出版のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LS	レソト	SI	スロヴェニア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CF	中央アフリカ共和国	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	IS	アイスランド	NE	ニジェール	US	米国
CH	スイス	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CI	コート・ジボアール	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CM	カメルーン	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア連邦		
DK	デンマーク	LC	セントルシア				

## 明 細 書

アラキドン酸含有食用油脂およびそれを含有する食品

## 5 技術分野

本発明は、不ケン化物の少ない、アラキドン酸生産能を有するモルティエラ属のモルティエラ亜属に属する微生物由来のアラキドン酸含有食用油脂及びこれを配合した食品、特に乳幼児用調製乳に関する。

10 本発明において、「不ケン化物」とは、微生物由来のものをいう。従って本発明で不ケン化物という用語は、後から添加したものを含まない微生物由来のものを指している。

## 背景技術

アラキドン酸は、子宮筋収縮、弛緩作用、血管拡張、血圧降下作用等、  
15 強力かつ多彩な生理活性を有するプロスタグランジン、トロンボキサン、  
プロスタサイクリン、ロイコトリエン等の前駆物質といわれ、近年注目  
されているが、特に乳児の発育に必要な成分として、DHA（ドコサヘ  
キサエン酸）とともに急速に研究が進められている。すなわちL a n t  
i n gらは生後3週間以上母乳で育てた乳児と育児用粉乳で育てた乳児  
20 を9歳まで追跡調査し、行動面などから脳神経の小さな障害の発生率を  
検討した結果、育児粉乳で育った子供の脳障害発生率は母乳で育った子  
供の2倍であると報告した〔L A N C E T、V o l. 3 4 4, 1 3 1 9  
- 1 3 2 2（1 9 9 4）〕。このショッキングな結果は母乳には存在す  
るが育児用粉乳にはほとんど存在しないDHAおよびアラキドン酸など  
25 の長鎖不飽和脂肪酸が脳の発達に関与したためだろうと推測されている。  
育児用粉乳を、乳児にとって理想の栄養とされる母乳に近づける研究が

以前より行われてきたが、今までそれら母乳の基本的な栄養素、ビタミン、ミネラルなどと感染防御作用の解明に重点が置かれてきた。しかしながら最近では、長鎖多価不飽和脂肪酸の脳への影響にも関心が向けられつつある。このほかにも近年、長鎖不飽和脂肪酸が新生児の脳および網膜の発達に関係しているだろうとする結果が相ついで報告されるようになり、未熟児および新生児栄養の領域においてホットな話題として注目されている。アラキドン酸を大量に含有し、しかも食品、特に乳幼児用調製乳に安全に使用できる油脂の開発が望まれている。

このようなアラキドン酸は、動物界に広く分布しており、従来、動物の副腎腺や肝臓から抽出した脂質から分離されている。しかしながらアラキドン酸の含有量は少なく、また原材料の大量入手が困難であることなどから、アラキドン酸の供給方法としては不十分であった。一方、アラキドン酸生産能を有する種々の微生物を培養してアラキドン酸を得る方法が提案されている。この中でも、特にモルティエセラ属の微生物を用いることによって、アラキドン酸高含有油脂が得られることが知られている（特開昭63-44891、特開昭63-12290）。しかしこれらの油脂は安全性が高いと言われながらも微生物起源という問題により、世間に十分浸透しているわけではない。モルティエセラ属アルピナ種の微生物を培養して得られる油脂は、その大部分がトリグリセリド（約70重量%以上）及びリン脂質であり、この他にデスモステロール等の不ケン化物が含まれている。この不ケン化物の中には、それまで天然に存在することが知られていなかったシクロプロパン環を有するステロール、具体的には24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3β-オール（24, 25-methylenecholest-5-en-3β-ol）が存在することが確認されている〔LIPIDS、Vol.

27, No. 6, 481-483 (1992) } が、不ケン化物を構成する成分についての説明は十分ではない。

#### 発明の開示

5       そこで、本発明者等は、現段階では、アラキドン酸生産能を有するモルティエセラ属のモルティエセラ亜属に属する微生物の培養物から得られるアラキドン酸含有油脂においては、食経験の知られていない物質あるいは構造が解明されていない物質は極力、取り除くことが望ましいと考えた。従って本発明は、アラキドン酸生産能を有するモルティエセラ  
10   属のモルティエセラ亜属に属する微生物から得られるアラキドン酸含有油脂であって、不ケン化物含量が少なく、その中でも特に食経験のないシクロプロパン環を有するステロールを極力、含有せず、食品、特に乳幼児用調製乳の製造に適したアラキドン酸含有食用油脂を提供しようとするものである。

15

      本発明者等は、アラキドン酸生産能を有するモルティエセラ属に属する微生物の培養物から得られるアラキドン酸含有油脂においては、培養条件によって24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 $\beta$ -オール組成比を少なくすることができることを発見し、その発見により、食  
20   験の知られていない物質あるいは構造が解明されていない物質が極力、取り除かれたアラキドン酸含有油脂製造しようという方向性、すなわち新しい課題に思い至った。そこで、本発明者等は、上記の課題を達成するため、種々研究の結果、アラキドン酸生産能を有するモルティエセラ属のモルティエセラ亜属に属する微生物を栄養培地で常法により培養し  
25   たのち集菌し、該菌体からアラキドン酸高含有油脂を回収し、該油脂を通常の食用油脂の精製工程の脱ガム、アルカリ精製、脱色、脱臭などの

操作を適宜組み合わせることによって、アラキドン酸含量に影響を与えず、不ケン化物量を低下させ、シクロプロパン環を有するステロール等の食経験の知られていない物質あるいは構造が解明されていない物質を減少できることを見だし本発明を完成するに至った。

5

従って本発明は、不ケン化物含量が0.8重量%以下で、しかもアラキドン酸を20重量%以上含有する微生物由来のアラキドン酸含有食用油脂に関する。

また、本発明は、不ケン化物含量が0.6重量%以下で、しかもアラキドン酸を20重量%以上含有する微生物由来のアラキドン酸含有食用油脂に関する。

また、本発明は、不ケン化物含量が0.8重量%好ましくは0.6重量%以下で、しかもアラキドン酸を20重量%以上含有し、24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 $\beta$ -オール含量が0.3重量%以下好ましくは0.15重量%以下であるアラキドン酸含有食用油脂に関する。

さらにまた、本発明はこれらの油脂を配合してなる、未熟児用調製乳、幼児用調製乳、幼児用食品、又は妊産婦用食品等の食品に関する。

20 本発明の油脂はアラキドン酸生産能を有するモルティエレラ

(M o r t i e r e l l a) 属のモルティエレラ亜属に属する微生物を培養しその培養物から得られる微生物油であって、油脂に対し不ケン化物含量が0.8重量%以下、好ましくは0.6重量%以下、より好ましくは0.5重量%以下であり、しかも油脂中の総脂肪酸に対しアラキドン酸を20重量%以上、好ましくは30重量%以上、より好ましくは35重量%以上含有する。

25

さらに本発明の油脂は、24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 $\beta$ -オール含量が0.3重量%以下、好ましくは0.15重量%以下、より好ましくは0.04重量%以下であることが望ましい。

- 5      また本発明の油脂は、油脂中トリグリセリドを70%以上、好ましくは90重量%以上、より好ましくは92重量%以上含有することが望ましい。

- 10      また本発明の油脂は、水分が0.1%以下、酸価が0.5以下、過酸化価が5以下であり、色は、ロビボンダ法133.4mmセルにおいて黄が50以下、赤が10以下であり、アラキドン酸以外の脂肪酸を、ミリスチン酸が0.2~0.7%、パルミチン酸が10~16%、ステアリン酸が4~10%、オレイン酸が5~15%、リノール酸が5~15%、 $\gamma$ -リノレン酸が1~5%、 $\alpha$ -リノレン酸が0.1~2%、ジ  
15      ホモ $\gamma$ -リノレン酸が1~6%、エイコサペンタエン酸が0~1%、リグノセレン酸が2~7%含有することが望ましい。

- 本発明の食用油脂の製造に使用する微生物は、モルティエセラ  
(Mortierella) 属のモルティエセラ亜属に属し、アラキド  
20      ン酸生産能を有する微生物であれば、すべて使用することができる。こ  
のような微生物としては、例えばモルティエセラ・エロンガタ (Mortierella elongata) IFO 8570、モル  
ティエセラ・エキシグア (Mortierella exigua) I  
FO 8571、モルティエセラ・フィグロフィラ (Mortierella hygrophila) IFO 5941、  
25      モルティエセラ・アルピナ (Mortierella alpina)

I F O 8 5 6 8、A T C C 1 6 2 6 6、A T C C 3 2 2 2 1、A  
T C C 4 2 4 3 0、C B S 2 1 9. 3 5、C B S 2 2 4. 3 7、  
C B S 2 5 0. 5 3、C B S 3 4 3. 6 6、C B S 5 2 7. 7 2、  
C B S 5 2 9. 7 2、C B S 5 2 8. 7 2、C B S 6 0 8. 7 0、  
5 C B S 7 5 4. 6 8等を挙げることができる。これらの菌株はいずれ  
も、大阪市の財団法人醗酵研究所（I F O）、及び米国アメリカン・タ  
イプ・カルチャー・コレクション〔A m e r i c a n T y p e C u  
l t u r e C o l l e c t i o n（A T C C）〕及びC e n t r a a  
l b u r e a u v o o r S c h i m m e l c u l t u r e s（C B  
10 S）からなんら制限なく入手することができる。また、本発明者らが土  
壌から分離した菌株M o r t i e r e l l a e l o n g a t a（モル  
ティエレラ・エロンガタ）S A M 0 2 1 9〔日本国茨城県つくば市東  
1丁目1番3号、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（N a  
t i o n a l I n s t i t u t e o f B i o s c i e n c e a  
15 n d H u m a n - T e c h n o l o g y A g e n c y o f I n  
d u s t r i a l S c i e n c e a n d T e c h n o l o g y）、  
寄託日1986年3月19日、受託番号F E R M B P - 1 2 3 9〕を  
使用することもできる。これらのタイプカルチャーに属する菌株、ある  
いは自然界から分離した菌株は、そのまま用いることができるが、増殖  
20 及び／又は単離を1回以上行うことによって得られる元の菌株とは性質  
の異なる自然変異株を用いることもできる。

また、本発明に用いる微生物は、モルティエレラ（  
M o r t i e r e l l a）属のモルティエレラ亜属に属し、アラキドン  
25 酸生産能を有する微生物（野性株）の変異株又は組換え株、即ち、同じ  
基質を用いて培養したときに、元の野性株が産生する量と比べて、油脂



中のアラキドン酸含量が多くなるように、または総油脂量が多くなるように、あるいはその両方を意図して設計されたものが含まれる。さらに費用効果の優れた基質を効率よく用いて、対応する野性株と同量のアラキドン酸を産生するように設計された微生物も含まれる。

5

アラキドン酸生産能を有する微生物は、常法に従って培養することができる。例えば、その菌株の孢子、菌糸又は予め培養して得られた前培養液を、通常の液体培地又は固体培地に接種し培養することができる。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール、クエン酸、コーンスターチ等の一般的に使用されているものがいずれも使用できるが、特にグルコース、フラクトース、マルトース、グリセロール、クエン酸、コーンスターチが好ましい。窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カゼミノ酸、  
10 コーンスティブリカー、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、  
15 硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源を用いることができる。

また窒素源として大豆から得られる栄養源を用いることにより、油脂  
20 中の 24, 25-メチレンコレステ-5-エン-3 $\beta$ -オール組成比  
(油脂中の総ステロールに対する割合)を少なくすることができる。本  
発明で 사용할 ことができる大豆から得られる窒素源は、水分を除く成分あたりの窒素含量が2%以上、好ましくは3%以上、より好ましくは5%以上であることが望ましい。また大豆から得られる窒素源としては、  
25 脱脂大豆又はこれに熱処理；酸処理；アルカリ処理；酵素処理；化学修飾；熱処理、酸処理、アルカリ処理、酵素処理、化学修飾等を含む化学

的及び／又は物理的処理による変性及び／又は再生；水及び／又は有機溶媒を用いた一部成分の除去；濾過及び／又は遠心分離による一部成分の除去；凍結；粉碎；乾燥；篩分け等の加工を施したもの、あるいは未脱脂大豆に同様の加工を施したものを単独で又は複数組み合わせで使用  
5 することができ、一般的なものとしては大豆、脱脂大豆、大豆フレーク、食用大豆タンパク、おから、豆乳、きな粉等が挙げられるが、特に脱脂大豆に熱変性を施したもの、より好ましくは脱脂大豆に熱変性を施しさらにエタノール可溶性成分を除去したものが好ましい。

10 この他必要に応じリン酸塩、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅、硫酸ナトリウム等の無機塩及びビタミン等も微量栄養源として使用できる。この培地成分は微生物の生育を害しない濃度であれば特に制限はない。実用上一般に、炭素源は0.1  
～30重量%、好ましくは0.5～15重量%、さらに好ましくは1～  
15重量%の濃度とし、窒素源は0.01～10重量%、好ましくは0.  
15 1～5重量%の濃度とすることが望ましい。また培養温度は、5～40℃、好ましくは20～30℃とし、培地のpHは4～10、好ましくは5～8として通気攪拌培養、振盪培養、又は静置培養を行う。培養は通常2～20日間行う。

20

固体培地で培養する場合は、固形物重量に対して50～100重量%の水を加えたふすま、もみがら、米ぬか等を用い、5～40℃、好ましくは20～30℃の温度において3～20日間培養を行う。この場合に必要に応じて培地中に窒素源、無機塩類、微量栄養源を加えることがで  
25 きる。

アラキドン酸の生産量を増加せしめるために、アラキドン酸の前駆体として、例えば、ヘキサデカンもしくはオクタデカンのごとき炭化水素；オレイン酸もしくはリノール酸のごとき脂肪酸又はその塩、例えばナトリウム塩もしくはカリウム塩、又は脂肪酸エステル、例えばエチルエステル、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル；又は  
5 オリーブ油、綿実油もしくはヤシ油のごとき油脂類を単独で、又は組み合わせて添加することができる。これらの添加物は一度に添加することもでき、又は連続的に、もしくは複数回に分けて経時的に添加することもできる。培養開始前においては炭化水素、脂肪酸もしくはその塩、又は  
10 は油脂類の添加が好ましく、培養中においては脂肪酸もしくはその塩又は脂肪酸エステル、又は油脂類の添加が好ましい。

このように培養して、菌体内に、アラキドン酸を含有する脂質が生成蓄積される。液体培地を使用した場合には、培養菌体から次のようにして  
15 アラキドン酸含有脂質の回収を行う。

培養終了後、培養液より遠心分離及び／又は濾過等の常用の固液分離手段により培養菌体を得る。培養菌体は好ましくは、水洗、破碎、乾燥する。乾燥は、凍結乾燥、風乾等によって行うことができる。乾燥菌体  
20 は、好ましくは窒素気流下で有機溶媒によって抽出処理する。有機溶媒としてはエーテル、ヘキサン、メタノール、エタノール、クロロホルム、ジクロロメタン、石油エーテル等を用いることができ、またメタノールと石油エーテルの交互抽出やクロロホルム－メタノール－水の一層系の溶媒を用いた抽出によっても良好な結果を得ることができる。抽出物か  
25 ら減圧下で有機溶媒を留去することにより、高濃度のアラキドン酸含有油脂を得ることができる。

また、上記の方法に代えて湿菌体を用いて抽出を行うことができる。  
この場合にはメタノール、エタノール等の水に対して相溶性の溶媒、又はこれらと水及び／又は他の溶媒とからなる水に対して相溶性の混合溶媒を使用する。その他の手順は上記と同様である。

上記のようにして得られたアラキドン酸含有脂質は、その大部分がトリグリセリド（約70重量%以上）及びリン脂質（約30重量%以下）であり、この他にデスモステロール等の不ケン化物が含まれている。そして該不ケン化物の中には構造が解明されていない物質や食経験が知られていない物質、例えば食経験が知られていないシクロプロパン環を有するステロールが存在しており、具体的には24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 $\beta$ -オールが存在している。

本発明の油脂は、上記アラキドン酸生産能を有するモルティエラ属のモルティエラ亜属の微生物を培養して得られたアラキドン酸含有油脂に以下の精製処理を施すことにより製造することができる。すなわち、どのような油脂を対象とし、何を取り除こうとしているかが決まった後は、通常の食用油脂の精製工程の脱ガム、アルカリ精製、脱色、脱臭などの操作を適宜組み合わせることによって上記アラキドン酸生産能を有するモルティエラ属の微生物を培養して得られたアラキドン酸含有油脂から、アラキドン酸含量に影響を与えず、シクロプロパン環を有するステロールや構造が解明されていない物質を含んでいる不ケン化物を除去することができる。

25

本発明は精製手段としてカラムクロマト法を採用する。本発明は活性

アルミナ、活性炭、モレキュラーシーブズ、シリカゲル、活性白土、ケイソウ土、銀担持シリカゲルおよび／またはイオン交換樹脂を使用する。このゲルを充填剤として用いることにより、上記アラキドン酸含有油脂を精製する。すなわちこれらのゲルを充填したカラムに、上記アラキドン酸含有油脂と、展開溶媒としてヘキサン、エタノール、超臨界流体等の有機溶媒を別々に、または混合して一定の流速で流すことによって、不ケン化物と精製されたものを展開溶出させる。クロマト法としては疑似移動床法を用いることもできる。

10 有機溶媒を蒸留などの方法により除去した後、さらに水蒸気蒸留で処理する。すなわち、水蒸気蒸留で微量の臭いの成分や低沸点の不ケン化物まで除去することができる。またクロマト法を用いた残存する微量の有機溶媒も併せて除去することができる。アラキドン酸を含有し不ケン化物を実質的に含有しない食用油脂組成物が得られる。なおカラムクロマト法と水蒸気蒸留、超臨界流体での分別蒸留の他に、公知の精製手段を併用することができる。

本発明のアラキドン酸含有油脂は、食経験の知られていない24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 $\beta$ -オール含量が少ないため、食品成分として使用することができる。食品の種類は特に限定されないが、例えば油脂を含む食品が挙げられ、例えば、肉、魚、ナッツ等の油脂を含む天然食品、中華料理、ラーメン、スープ等の調理時に油脂を加える食品、天ぷら、フライ、油揚げ、チャーハン、ドーナッツ、カリン糖等の熱媒体として油脂を用いた食品、バター、マーガリン、マヨネーズ、ドレッシング、チョコレート、即席ラーメン、キャラメル、ビスケット、アイスクリーム等の油脂食品又は加工時に油脂を加えた加工食品、おか

き、ハードビスケット、あんパン等の加工仕上げ時に油脂を噴霧又は塗布した食品等をあげることができる。しかし、油脂を含む食品に限定しているわけではなく、例えばパン、めん類、ごはん、菓子類、豆腐およびその加工食品などの農産食品、清酒、薬用酒などの醗酵食品、みりん、食酢、醤油、味噌、ドレッシング、ヨーグルト、ハム、ベーコン、ソーセージ、マヨネーズなどの畜産食品、かまぼこ、揚げ天、はんぺんなどの水産食品、果汁飲料、清涼飲料、スポーツ飲料、アルコール飲料、茶などの飲料等も挙げることができる。

10      また本発明の油脂は、食経験の知られていない24, 25-メチレンコレステ-5-エン-3 $\beta$ -オール含量が少なく、しかもアラキドン酸をトリグリセリドの形で豊富に含有し、エイコサペンタエン酸を含有しないか、含有しても極微量であるため、特に未熟児用調製乳、乳児用調製乳、幼児用食品、又は妊産婦用食品の原料として好ましい。

15      さらに本発明の油脂は、特定用保健食品を含む機能性食品（あるいは健康食品）に用いることができ、食品の形態は、一般の食品形態であっても、またカプセル、顆粒、錠剤、ドリンク剤、経腸栄養剤等の形態であってもよい。

20      発明を実施するための最良の形態

本願発明の詳細を実施例で説明する。本願発明はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。

## 25      実施例 1

アラキドン酸生産菌としてモルティエラ・アルピナ（

Mortierella alpina) CBS 754.68を用い、グルコース2%、酵母エキス1%、大豆油0.2%を含む培地14001を20001培養槽に入れ、温度28℃、通気量1.0vvm、搅拌80rpm、槽内圧1.0kg/cm<sup>2</sup>Gの条件で、通気搅拌培養を開始した。流加法によりグルコース濃度を1.5%に維持し、7日間の培養後、濾過により菌体を回収し、25kgの乾燥菌体を得た。このようにして得られた乾燥菌体の1kgにヘキサン5lを加え、穏やかに30分間搅拌した。その後、吸引濾過し、濾液をロータリーエバポレーターで溶媒留去し、抽出粗油脂590gを得た。

10 オープンカラムにシリカゲル450gを充填した。得られた抽出粗油脂590gをヘキサンで5倍に希釈し、カラムで精製後、ヘキサンを留去し、450gのカラム処理油脂を得た。該油脂をさらに水蒸気蒸溜で脱臭し、抗酸化剤としてトコフェロール0.04%を加え、精製油脂を得た。

15

#### 比較例1

実施例1と同様に抽出し、カラムにはかけず、水蒸気蒸溜で脱臭し、これにトコフェロール0.04%を添加し、精製油脂を得た。

#### [不ケン化物含量の測定]

20 実施例1と比較例1で得られた精製油脂について、不ケン化物含量を下記の方法に従って測定した。結果を表1に示す。

本発明において、不ケン化物含量とは、日本油化学協会の基準油脂分析試験法の不ケン化物の定量に記載された規定の方法に基づき、油脂をケン化したのち、定量に使用する溶剤にて抽出される物質より混入脂肪酸量を削除し試料に対する百分率として表したものをいう。但し、精製後

25 後に添加した例えばトコフェロールのような不ケン化物量は差し引くも

のとする。

上記規定の方法の概略は以下の通りである（油化学、13、489（1996）参照）。

5 フラスコに試料約5 gを取り、1 N-エタノールカリ50 mlを加え、  
穏やかに1時間沸騰しケン化させる。ケン化が終われば加熱をやめ、温  
水100 mlでケン化用フラスコを洗いながら、ケン化液を分液漏斗に  
移しこれに水50 mlを加えて室温になるまで冷却する。次にエチルエ  
ーテル100 mlをケン化用フラスコを洗いながら分液漏斗に加え、分  
液漏斗に密栓して1分間激しく振り混ぜた後、明らかに2層に分かれる  
10 まで静置する。分かれた下層を第2の分液漏斗に移し、これにエチルエ  
ーテル50 mlを加え、第1の分液漏斗と同様に振り混ぜた後、静置し、  
2層に分かれたならば、下層は第3の分液漏斗に移し、同様にエチルエ  
ーテル50 mlで抽出を行う。

第2、第3の分液漏斗中のエチルエーテル層は、各分液漏斗を少量の  
15 エチルエーテルで洗浄しつつ第1の分液漏斗に移し、これに水30 ml  
を加えて振り混ぜたのち静置して2層に分け下層を除く。さらに毎回水  
30 mlを振り混ぜては静置分別を繰り返して、分別した水がフェノー  
ールフタレイン指示薬で着色しなくなるまで洗浄する。洗浄したエチルエ  
ーテル抽出液は必要に応じて硫酸ナトリウム（無水）で脱水処理した後、  
20 乾燥した濾紙で濾過して蒸留フラスコに移し、なお抽出液の諸容器、濾  
紙などはすべて少量のエチルエーテルで洗浄してこれも蒸留フラスコに  
加える。蒸留フラスコのエチルエーテルを蒸留除去してその液量が50  
ml程度となったならば冷却し、少量のエチルエーテルでフラスコを洗  
いながら濃縮されたエチルエーテル抽出液をあらかじめ正しく重量のは  
25 かれた100 ml丸底フラスコに移す。

丸底フラスコのエチルエーテルをほとんど蒸留除去し、次にアセトン



3 ml を加えて前同様その大部分を蒸留除去した後、軽い減圧下（200 mmHg 程度）、70～80℃に30分加熱してから丸底フラスコを真空デシケーター中に移し、30分放置冷却する。丸底フラスコの重量を正しくはかり抽出物の重量を求めておく。

- 5 丸底フラスコにエチルエーテル 2 ml と中性エタノール 10 ml とを加えてよく振り混ぜ、抽出物を溶解した後、フェノールフタレイン指示薬を用い N/10-エタノールカリ標準液で、混入する脂肪酸を滴定指示薬の微紅色が30秒続いたとき終点とする。

$$10 \quad \text{不ケン化物含量 (\%)} = A - (B \times F \times 0.0282) / C \times 100$$

混入する脂肪酸（オレイン酸として、g）=  $B \times F \times 0.0282$

ただし、A = 抽出物の重量（g）

B = N/10-エタノールカリ標準液の使用量（ml）

$$15 \quad C = \text{試料採取量 (g)}$$

F = N/10-エタノールカリ標準液の力価

[アラキドン酸含量の測定]

- 実施例 1 と比較例 1 で得られた精製油脂について、下記の方法に従って脂肪酸メチルを調製し、アラキドン酸含量をガスクロマトグラフィーで測定した。結果を表 1 に示す。
- 20

表 1

	不けん化物含量 (%)	* 重金属	24, 25-メチレンコレスト-5 -エン-3 $\beta$ -オール含量(%)	アラキドン酸含量 (%)
5 実施例 1	0.5	検出せず	0.26	38
比較例 1	1	検出せず	0.51	39

\* 検出限界 0.5 ppm

メチルエステルの調製

10 サンプル 15 mg を精秤し、無水エタノール-塩酸 (95 : 5) を用いて、50℃で3時間処理することによって、メチルエステル化し、脂肪酸メチルをヘキサンで完全に抽出し、ガスクロマトグラフィーで分析した。ガスクロマトグラフィーの条件は以下の通りである。

## 使用カラム

15 液相 Advance-DS5%  
担体 Chromosorb W (AW-DMCS)  
粒度 80-100メッシュ  
サイズ 内径 3 mm × 2.1 m  
キャリアガス 窒素 60 mL/m

20 検出器 FID  
カラム温度 190℃  
検出器温度 250℃  
注入口温度 240℃

25 [24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 $\beta$ -オール含量の測定]

実施例1と比較例1で得られた精製油脂について、下記の方法に従って24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 $\beta$ -オール含量を測定した。結果を表1に示す。

まず、ステロール組成分析法を説明する。原料油脂を30~80mg、  
5 栓付き試験管内に秤量し、メタノール4ml及び33%水酸化カリウム水溶液1mlを添加し栓をする。これで80℃で緩く攪拌しながら1時間反応させた後、放冷し、脂溶成分をヘキサンで抽出する。得られたヘキサン溶液をフェノールフタレイン指示薬が水層に着色しなくなるまで水洗し、減圧濃縮により分析サンプルを得る。分析サンプルを少量のヘ  
10 キサンに溶解し、以下に示す条件のガスクロマトグラフィーに供する。  
市販のコレステロールを内部標準に用い、FID検出面積/検出重量比が全てのステロールで同じとの前提に基づいて、原料油脂に対する重量比を求めた値を24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 $\beta$ -オール含量とする。

15 ガスクロマトグラフィーの分析条件

使用カラム ULBON HR-1 (内径0.25mm、  
長さ25m)

カラム温度 280℃

注入口及び検出器温度 300℃

20 キャリアガス及びゲージ圧力 ヘリウム 1.2kg/cm<sup>2</sup>

メイクアップガス及び流量 窒素 70ml/min

検出器 FID

スプリット比: 20

25 実施例2

アラキドン酸生産菌としてモルティエレラ・アルピナ (

Mortierella alpina) CBS 527.72、モルティエラ・アルピナ (Mortierella alpina) ATCC 42430、モルティエラ・ヒグロフィラ (Mortierella hygrophila) IFO 5941、モ  
5 ルティエラ・エロンガタ (Mortierella elongata) IFO 8570を用い、それぞれ培養を行った。グルコース4%、酵母エキス1%、大豆油0.2%を含む培地6001を10001培養槽に入れ、温度28℃、通気量1.0vvm、攪拌100rpm、槽内圧0.5kg/cm<sup>2</sup>Gの条件で、7日間の通気攪拌培  
10 養を行い、濾過、乾燥により乾燥菌体を回収した。

得られた乾燥菌体に対して、実施例1及び比較例1と同様の処理を行い、得られた精製油脂の不ケン化物含量、24, 25-メチレンコレステ-5-エン-3β-オール含量、アラキドン酸含量を測定した。

結果を表2に示す。

15 カラム処理を行うことによって、アラキドン酸含量に影響を及ぼすことなく、不ケン化物含量及び24, 25-メチレンコレステ-5-エン-3β-オール含量の少ない精製品を得ることができた。

表 2

菌株		不飽和化合物含量 (%)	24, 25-メチレンコレステ- 5-エン-3 $\beta$ -オール 含量 (%)	アラキドン酸含量 (%)
M. alpina CBS527.72	実施例	0.6	0.22	33
M. alpina CBS527.72	比較例	1.6	0.62	33
M. alpina ATCC42430	実施例	0.3	0.11	26
M. alpina ATCC42430	比較例	0.9	0.33	27
M. hygrophila IF05941	実施例	0.5	0.15	23
M. hygrophila IF05941	比較例	1.6	0.52	22
M. elongata IF08570	実施例	0.4	0.23	21
M. elongata IF08570	比較例	1	0.58	21

## 実施例 3

アラキドン酸生産菌としてモルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) CBS754.68を用い、グルコース2%、酵母エキス1%、大豆油0.1%を含む培地1400 lを2000 l培養槽に入れ、温度24℃、通気量0.5 vvm、攪拌100 rpm、槽内圧1.0 kg/cm<sup>2</sup>Gの条件で、通気攪拌培養を開始した。流加法によりグルコース濃度を1.5%に維持し、9日間の培養後、濾過により菌体を回収し、20 kgの乾燥菌体を得た。このようにして得られた乾燥菌体の3 kgにヘキサン15 lを加え、穏やかに30分間攪拌した。その後、吸引濾過し、濾液をロータリーエバポレーターで溶媒留去し、抽出粗油脂1800 gを得た。

得られた抽出粗油脂 1000 g に対して実施例 1 と同様のカラム処理を行い、900 g のカラム処理油脂を得た。得られたカラム処理油脂の 500 g、及び抽出粗油脂 800 g に対しては、不ケン化物を蒸留処理した。

5      このようにして得られたカラム処理油脂、蒸留処理油脂、カラム及び蒸留処理油脂を、それぞれ水蒸気蒸留で脱臭し、抗酸化剤としてトコフェノール 0.04% を加えた。得られた精製油脂の不ケン化物含量、24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 $\beta$ -オール含量、アラキドン酸含量を測定した。

10      結果を表 3 に示す。

カラム処理及び／又は蒸留処理を行うことによって、アラキドン酸含量に影響を及ぼすことなく、不ケン化物含量及び 24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 $\beta$ -オール含量の少ない精製品を得ることができた。

15

表 3

20

処理方法	不ケン化物含量 (%)	24, 25-メチレンコレスト -5-エン-3 $\beta$ -オール 含量(%)	アラキドン酸含量 (%)
カラム処理→脱臭	0.38	0.14	42
蒸溜→脱臭	0.4	0.15	41
20   カラム処理→蒸溜→脱臭	0.36	0.13	43

#### 実施例 4

大豆タンパク（商品名：エスサンミート、味の素（株）製）1% を酵母エキスに代わる培地成分として用いて実施例 1、比較例 1 と同様の方法で培養し、得られた菌体より、実施例 1、比較例 1 と同様の処理を行  
25   い、得られた油脂について、不ケン化物含量、24、25メチレンコレ

ストー5-エン-3 $\beta$ -オール含量、アラキドン酸含量を測定した。結果を表4に示す。

表4

	不ケン化物含量	24,25-メチレンコレスト-5- エン-3 $\beta$ -オール含量	アラキドン酸含量
実施例4	0.5%	0.09%	37%
比較例4	1.1%	0.20%	37%

#### 実施例5

アラキドン酸生産菌としてモルティエレラ・アルピナ  
(Mortierella alpina) ATCC 32221を用  
い培養を行った。グルコース4%、脱脂大豆粉1.2%、リン酸水素カ  
リウム0.2%、大豆油0.1%を含む培地25Lを50L培養槽に入  
れ、温度28℃、通気量1.0vvm、攪拌300rpm、槽内圧1.  
0kg/cm<sup>2</sup>Gの条件で5日間の通気攪拌培養を行い、濾過、乾燥に  
よりアラキドン酸含有菌体を回収した。得られた菌体により、実施例1、  
比較例1と同様の処理を行い、得られた油脂について、不ケン化物含量、  
24、25メチレンコレスト-5-エン-3 $\beta$ -オール含量、アラキド  
ン酸含量を測定した。結果を表5に示す。

表5

	不ケン化物含量	24,25-メチレンコレスト-5- エン-3 $\beta$ -オール含量	アラキドン酸含量
実施例5	0.5%	0.02%	25%
比較例5	0.9%	0.05%	25%

## 請 求 の 範 囲

1. 不ケン化物含量が0.8重量%以下で、かつ、アラキドン酸含量が20重量%以上である微生物由来のアラキドン酸含有食用油脂。
- 5 2. 不ケン化物含量が0.6重量%以下である請求項1の微生物由来のアラキドン酸含有食用油脂。
3. さらに24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 $\beta$ -オールが0.3重量%以下である請求項1又は2の微生物由来のアラキドン酸含有食用油脂。
- 10 4. 24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 $\beta$ -オール含量が0.15重量%以下である請求項3の微生物由来のアラキドン酸含有食用油脂。
5. 前記微生物がアラキドン酸生産能を有するモルティエセラ属のモルティエセラ亜属に属する微生物である請求項1ないし4のいずれかの微生物由来のアラキドン酸含有食用油脂。
- 15 6. 前記モルティエセラ亜属に属する微生物が、モルティエセラ属アルピナ種に属する微生物である請求項5の微生物由来のアラキドン酸含有食用油脂。
7. 請求項1ないし6のいずれかのアラキドン酸含有食用油脂を配合
- 20 してなる食品。
8. 請求項1ないし6のいずれかのアラキドン酸含有食用油脂を配合してなる、未熟児用調製乳、幼児用調製乳、幼児用食品、又は妊産婦用食品。



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03631

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> A23D9/007

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> A23D9/007

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 9428913, A (Mertek Biosciences Corp.), December 22, 1994 (22. 12. 94) & EP, 707487, A	1 - 8
X	JP, 8-214893, A (Omegatech Inc.), August 27, 1996 (27. 08. 96) & EP, 726321, A	1-4, 7, 8
X	JP, 6-505384, A (Mertek Corp.), June 23, 1994 (23. 06. 94) & WO, 9213086, A & EP, 568608, A	1 - 8
X	Kengo Akimoto, Akira Shimizu "Production and utilization of highly unsaturated fatty acids (in Japanese)", New Food Industry, September 1, 1995, Vol. 37, No. 9, pages 1 to 9	1 - 8
Y	JP, 63-116643, A (Kazumitsu Maruta), May 20, 1988 (20. 05. 88) (Family: none)	1 - 8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
November 10, 1997 (10. 11. 97)Date of mailing of the international search report  
November 18, 1997 (18. 11. 97)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03631

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 63-44891, A (Suntory Ltd.), February 25, 1988 (25. 02. 88) & EP, 276541, A & US, 5204250, A	1 - 8
Y	JP, 63-12290, A (Lion Corp.), January 19, 1988 (19. 01. 88) & EP, 223960, A	1 - 8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl. A 23 D 9 / 007

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl. A 23 D 9 / 007

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 9428913, A (Mertek Biosciences Corporation) 22. 12月. 1994 (22. 12. 94) & EP, 707487, A	1-8
X	JP, 8-214893, A (オメガテック インコーポレイテッド) 27. 8月. 1996 (27. 08. 96) & EP, 726321, A	1-4, 7, 8
X	JP, 6-505384, A (マーテック・コーポレイション) 23. 6月. 1994 (23. 06. 94) & WO, 9213086, A & EP, 568608, A	1-8
X	秋元健吾、清水昌、高度不飽和脂肪酸の生産と利用, New Food Industry, 1. 9月. 1995, 第37巻、第9号、第1-9頁	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 10. 11. 97

国際調査報告の発送日

18.11.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉住 和之

4 B

9165

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 63-116643, A (丸田和光) 20. 5月. 1988 (20. 05. 88) ファミリーなし	1-8
Y	JP, 63-44891, A (サントリー株式会社) 25. 2月. 1988 (25. 02. 88) & EP, 276541, A & US, 5204250, A	1-8
Y	JP, 63-12290, A (ライオン株式会社) 19. 1月. 1988 (19. 01. 88) & EP, 223960, A	1-8